

Mittel und Verfahren zur Behandlung und Prävention von
TSE sowie Verfahren zur Herstellung des Mittels

Die Erfindung betrifft ein Mittel und ein Verfahren zur Behandlung und zur Prävention von TSE sowie ein Verfahren zur Herstellung des Mittels.

Das Auftreten der transmissiblen spongiformen Enzephalopathie (TSE) wird nach Ergebnissen der jüngeren medizinischen Forschung ursächlich mit Prionen in Verbindung gebracht. Die Krankheit zeichnet sich durch schwammartige Veränderungen im Gehirn aus. Als Haupt-Krankheitserreger wurden Prione identifiziert. Prione bestehen überwiegend aus Prionprotein (PrP) in einer pathogenen Konformation (PrP^{Sc}). Auch der gesunde Organismus produziert Prionprotein, allerdings in einer nicht pathogenen, ungefährlichen Konformation (PrP^C). PrP^C und PrP^{Sc} besitzen die gleiche Aminosäuresequenz, zeigen jedoch einen erheblichen Unterschied in der Sekundärstruktur. PrP^C enthält einen relativ hohen α -helikalen Anteil und fast keine β -Faltblatt-Elemente. PrP^{Sc} hingegen weist mit einem erhöhten β -Faltblatt-Anteil und geringeren α -Helix-Anteil eine von PrP^C verschiedene Sekundärstruktur auf. Demnach handelt es sich bei PrP^C und PrP^{Sc} um Strukturisomere. Außerdem ist PrP^{Sc} im Gegensatz zu PrP^C resistent gegen Proteinase-K-Verdau. Dabei scheint PrP^{Sc} posttranslational aus PrP^C gebildet zu werden. Entstehung und Entwicklung der Krankheit sind abhängig von der fortgesetzten Umwand-

lung von PrP^C in PrP^{Sc}. Die Faktoren die für die Umwandlung von PrP^C in PrP^{Sc} verantwortlich sind, sind noch nicht alle bekannt.

5 Alle bisher verfolgten Ansätze zu einer TSE-Therapie haben die Suche nach Wirkstoffen zum Ziel, die gezielt und spezifisch an PrP^{Sc} binden oder dessen Bindung an PrP^C blockieren sollen, wie es in der Veröffentlichung von C.Soto Biochem. Soc. Trans. 2002 Aug. 30(4): 569-574 zusammengefasst wird.

10 Es ist daher die Aufgabe der Erfindung einen pharmazeutischen Wirkstoff und ein alternatives Verfahren zur Verfügung zu stellen, mit denen die Krankheit TSE geheilt, gelindert oder präventiv behandelt werden kann.

15 Überraschenderweise wurde gefunden, dass eine Verlangsamung und sogar Inhibierung der PrP^{Sc}-Bildung bewirkt werden kann, wenn prioninfizierten Zellen bestimmte Peptide, zugeführt werden. Hierbei wird angenommen, dass sich die erfindungsgemäßen Peptide an das PrP^C anlagern und so die Umwandlung von natürlich vorkommendem
20 PrP^C in das pathogene PrP^{Sc} verhindern. Es wurden erfindungsgemäß verschiedene Peptide mit teilweise charakteristischen Aminosäure - Untersequenzblöcken identifiziert, die eine Linderung der Symptomatik oder sogar eine Heilung der Krankheit TSE zur Folge haben. Bei-
25 spielhafte Peptide sind in den Sequenzen 1 bis 27 angegeben. Als erfindungsgemäß einsetzbare Peptide wurden folgende Sequenzen identifiziert, die in Richtung Amino- zu Carboxylterminus zu lesen sind, von denen eine

Komponente oder ein Gemisch aus mindestens zwei Komponenten zur Behandlung eingesetzt werden können:

Alle Sequenzen die mindestens eine Komponente aus mindestens einer der Gruppen bestehend aus

(B)

- 5 A) Val und Asp, Met und Ile, Asp und Val, Gln und Pro,
 Thr und Pro, Leu und Asp, Asp und Ser, Arg und His,
 Thr und Tyr, Val und Tyr, Arg und Pro, Pro und Leu,
 Leu und Pro, Pro und Ser, Ser und Pro, Leu und Lys,
 Lys und Ala, Ala und Thr, Thr und Thr, Thr und Asn,
10 Asn und Ser, Ser und Lys, Lys und Leu, Leu und Met,
 Met und Met, Met und Tyr, Trp und His, His und Trp,
 Trp und Gln, Gln und Trp, Trp und Thr, Thr und Pro,
 Pro und Trp, Trp und Ser, Ser und Ile, Ile und Gln,
 Gln und Pro;
- 15 B) Leu und Asp und Ser, Val und Asp und Met, Asp, Met
 und Ile, Met, und Ile und Asn, Asp und Val und Gln,
 Val und Gln und Pro, Gln und Pro und Leu, Gln und
 Pro und Met, Pro und Leu und Thr, Leu und Thr und
 Pro, Leu und Asp und Ser, Asp und Ser und Ser, Asp
20 und Ser und Cys, Arg und His und Ala, His und Ala
 und Thr, Ala und Thr und Tyr, Val und Tyr und Ser,
 Tyr und Ser und Ser, Arg und Pro und Leu, Pro und
 Leu und Pro, Leu und Pro und Ser, Pro und Ser und
 Pro, Leu und Lys und Ala, Lys und Ala und Thr, Ala
25 und Thr und Thr, Thr und Thr und Asn, Thr und Asn
 und Ser, Asn und Ser und Lys, Ser und Lys und Leu,
 Lys und Leu und Met, Leu und Met und Met, Met und
 Met und Tyr, Trp und His und Trp, His und Trp und
 Gln, Trp und Gln und Trp, Gln und trp und Thr, Trp

und Thr und Pro, Thr und Pro und Trp, Pro und Trp
und Ser, Trp und Ser und Ile, Ser und Ile und Gln,
Ile und Gln und Pro;

5 C) Val und Asp und Met und Ile, Asp und Val und Ile und
Pro, Leu und Asp und Ser und Ser, Arg und His und
Ala und Thr, His und Ala und Thr und Tyr, Val und
Tyr und Ser und Ser, Arg und Pro und Leu und Pro,
Pro und Leu und Pro und Ser, Leu und Pro und Ser und
10 Pro, Leu und Lys und Ala und Thr, Lys und Ala und
Thr und Thr, Ala und Thr und Thr und Asn, Thr und
Thr und Asn und Ser, Thr und Asn und Ser und Lys,
Asn und Ser und Lys und Leu, Ser und Lys und Leu und
Met, Lys und Leu und Met und Met/, Leu und Met und
Met und Tyr, Trp und His und Trp und Gln, His und
15 Trp und Gln und Trp, Trp und Gln und Trp und Thr,
Gln und Trp und Thr und Pro, Trp und Thr und Pro und
Trp, Thr und Pro und Trp und Ser, Pro und Trp und
Ser und Ile, Trp und Ser und Ile und Gln, Ser und
Ile und Gln und Pro;

20 D) Val und Asp und Met und Ile und Asn, Asp und Met und
Ile und Asn und Asp, Met und Ile und Asn und Asp und
Val, Ile und Asn und Asp und Val und Gln, Asn und
Asp und Val und Gln und Pro, Asp und Val und Gln und
Pro und Leu, Asn und Asp und Val und Gln und Pro,
25 Asp und Val und Gln und Pro und Leu, Val und Gln und
Pro und Leu und Thr, Gln und Pro und Leu und Thr und
Pro, Leu und Asp und Ser und Ser und Arg, Arg und
His und Ala und Thr und Tyr, Leu und Lys und Ala und
Thr und Thr, Lys und Ala und Thr und Thr und Asn,
30 Ala und Thr und Thr und Asn und Ser, Thr und Thr und

Asn und Ser und Lys, Thr und Asn und Ser und Lys und
Leu, Asn und Ser und Lys und Leu und Met, Ser und
Lys und Leu und Met und Met, Lys und Leu und Met und
Met und Tyr, Trp und His und Trp und Gln und Trp,
5 His und Trp und Gln und Trp und Thr, Trp und Gln und
Trp und Thr und Pro, Gln und Trp und Thr und Pro und
Trp, Trp und Thr und Pro und Trp und Ser, Trp und
Thr und Pro und Trp und Ile, Thr und Pro und Trp und
Ile und Gln, Pro und Trp und Ile und Gln und Pro;

10 E) Val und Asp und Met und Ile und Asn und Asp, Val und
Gln und Pro und Leu und Thr und Pro, His und Ser und
Pro und Leu und Asp und Ser, Ser und Arg und His und
Ala und Thr und Tyr, Leu und Lys und Ala und Thr und
Thr und Asn, Lys und Ala und Thr und Thr und Asn und
15 Ser, Ala und Thr und Thr und Asn und Ser und Lys,
Thr und Thr und Asn und Ser und Lys und Leu, Thr und
Asn und Ser und Lys und Leu und Met, Asn und Ser und
Lys und Leu und Met und Met, Ser und Lys und Leu und
Met und Met und Tyr, Trp und His und Trp und Gln und
20 Trp und Thr, Trp und Gln und Trp und Thr und Pro und
Trp, Trp und Thr und Thr und Pro und Trp und Ser und
Ile, Pro und Trp und Ser und Ile und Gln und Pro;

F) Asp und Val und Gln und Pro und Leu und Thr und Pro,
Leu und Asp und Ser und Ser und Arg und His und Ala,
25 Ser und Ser und Arg und His und Ala und Thr und Tyr,
Leu und Lys und Ala und Thr und Thr und Asn und Ser,
Lys und Ala und Thr und Thr und Asn und Ser und Lys,
Ala und Thr und Thr und Asn und Ser und Lys und Leu,
Thr und Thr und Asn und Ser und Lys und Leu und Met,
30 Thr und Asn und Ser und Lys und Leu und Met und Met,

Asn und Ser und Lys und Leu und Met und Met und Tyr,
Trp und His und Trp und Gln und Trp und Thr und Pro,
Gln und Trp und Thr und Pro und Trp und Ser und Ile,
Thr und Pro und Trp und Ser und Ile und Gln und Pro;

- 5 G) Mindestens zwei Komponenten aus mindestens einer der Gruppen A) bis F);
- H) Sequenzen 1 - 27 des Sequenzprotokolls, welche alle 12 Aminosäuren mit den Positionen 1 - 12 umfassen, sind oder enthalten.
- 10 Diese Sequenzen können eine beliebige Länge haben, vorzugsweise eine Länge von 6 - 40, besonders bevorzugt 8 - 30, 10 - 20 oder noch bevorzugter 10-12 Aminosäuren lang sein.
- 15 In einigen speziellen Ausführungsformen können die folgenden Sequenzen vorliegen, die vorzugsweise 12 Aminosäuren lang sind.
- I) Aminosäuresequenzen, die in den Positionen 1, 2, 3 und 4 die Aminosäuren Leu, Lys, Ala, und Thr beinhalten;
- 20 J) Aminosäuresequenzen, die in den Positionen 6, 7, 8 und 9 die Aminosäuren Asn, Ser, Lys und Leu besitzen;
- K) Aminosäuresequenzen, die eine Kombination der Merkmale I) und J) beinhalten;
- 25

- L) Aminosäuresequenzen, die in den Positionen 4, 5 und 6 die Aminosäuren Gln, Trp und Thr besitzen;
- M) Aminosäuresequenzen, die in den Positionen 8 und 9 die Aminosäuren Arg und His besitzen;
- 5 N) Aminosäuresequenzen, die in den Positionen 11 und 12 die Aminosäuren Thr und Tyr besitzen;
- O) Alle Unterkombinationen mit 2 oder 3 Elementen der Gruppen L), M) und N);
- 10 P) Aminosäuresequenzen, die in den Positionen 1 und 2 die Aminosäuren Val und Tyr besitzen;
- Q) Aminosäuresequenzen, die in den Positionen 7, 8, 9, 10, 11, 12 die Aminosäuren Arg, Pro, Leu, Pro, Ser und Pro besitzen;
- 15 R) Aminosäuresequenzen, die eine Kombination aus N) und O) darstellen.

20 Die Sequenzabschnitte I) - R) können in Sequenzen enthalten sein, die beispielsweise eine Länge von 6³- 40, bevorzugt 8 - 30, 10 - 20 und besonders bevorzugt 10 - 12 Aminosäuren umfassen.

Figur 1 zeigt die Aminosäuresequenzen (im Einbuchstaben-code) der vier wirksamen Peptide, die im Phagen-display-Screening identifiziert wurden:

7a

"W1" HSPLDSSRHATY = Seq.Nr.8
"W2" VDMINDVQPLTP = Seq.Nr.2
"W3" VYSSTTRPLPSP = Seq.Nr.10
"W4" LKATTNSKLMMY = Seq.Nr.1

5

Die erfindungsgemäßen Peptide, welche eine Heilung von TSE oder eine Linderung bewirken, können nach bekannten Verfahren hergestellt werden.

10

So kann zur Herstellung eines chemisch-synthetischen Verfahrens zum Beispiel Festphasensynthesen oder eine

Synthese in flüssigem Medium herangezogen werden. Bei der Festphasensynthese werden die Aminosäuren in der Abfolge der Sequenz entsprechend den Sequenzprotokollen und der Auflistungen A) - R) miteinander verbunden. Die Festphasenpeptidsynthese besteht aus drei wesentlichen Schritten:

- 1) Aufbau der Aminosäurekette zum Peptid,
- 2) Spaltung des synthetisierten Peptids vom Harz und
- 3) gegebenenfalls Reinigung und Charakterisierung.

Für die Synthese der Aminosäurekette sind unterschiedliche Kopplungsmethoden bekannt, wie Sie beispielsweise in „Beyer Walter“ 22. ^{Vol.} Auflage ISBN 3-7776-0485-2, ^{pages} Seiten 829 - 834 beschrieben werden.

Die Peptide können auch durch Expression der für sie kodierenden Nukleotidsequenzen, zum Beispiel in Chromosomen, Plasmiden oder anderen Informationsträgern, nackte DNA oder RNA in Organismen, in Zellen oder zellfreien Systemen, hergestellt werden.

Gegenstand der Erfindung sind daher auch die Nukleinsäuren, welche für die Peptide gemäß den Aminosäuresequenzen A) - R) kodieren, einschließlich aller Allelvariationen sowie die Nukleotidsequenzen der Sequenzfolgen 1 - 27 einschließlich aller Allelvariationen.

Mit den erfindungsgemäßen Peptiden können alle Säugetiere einschließlich Menschen behandelt bzw. geheilt werden und die Peptide können auch zur Prävention eingesetzt werden. Besonders bevorzugt ist die Behandlung des Menschen es können aber auch Rinder und Schafe behandelt werden. Die erfindungsgemäßen Peptide lagern an

das PrP^C aller Säuger an, so dass die erfindungsgemäße Wirkung stattfinden kann. Der erfindungsgemäße Effekt findet auch statt, wenn mindestens zwei der genannten Peptide an das PrP^C binden.

- 5 Mit den erfindungsgemäßen Peptiden kann eine Behandlung der Krankheit TSE sowohl beim Menschen als auch bei Tieren vorgenommen werden. Zu den humanen Erkrankungen gehören das Creutzfeld-Jakob-Syndrom, Kuru, Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom und FFI (Fatal Familial
- 10 Insomnia). Beim Tier sind ebenfalls TSE- Erkrankungen bekannt, z. B. beim Schaf Scrapie, beim Rind bovine spongiforme encephatlopathie (BSE) bei Wildtieren chronic wasting disease (CWD).
- 15 Hierzu müssen die erfindungsgemäßen Peptide so appliziert werden, dass sie ihren Wirkort erreichen. Dieser Wirkort kann das Gehirn, das Rückenmark und/oder das gesamte Nervensystem sein, aber auch jeder andere Teil des Organismus. Hierzu können die erfindungsgemäßen Peptide in fester oder in einem Lösungsmittel, vorzugs-
- 20 weise Wasser gelöster Form in den Körper eingebracht werden. Als Feststoff können die Peptide beispielsweise oral, rektal oder als Pulver in die Nase eingeführt werden.
- 25 Der erfindungsgemäße Wirkstoff und die pharmazeutische Zusammensetzung können als flüssige, halbfeste oder feste Arzneiformen und in Form von z. B. Injektionslösungen, Tropfen, Säften, Sirupen, Spray, Suspensionen, Granulaten, Tabletten, Pellets, transdermalen therapeutischen Systemen, Kapseln, Pflastern, Zäpfchen, Salben,
- 30 Cremes, Lotionen, Gelen, Emulsionen oder Aerosolen vorliegen und verabreicht werden und enthalten die erfin-

5 dungsgemäßen Peptide in einer physiologisch verträglichen Form und in Abhängigkeit des Applikationsweges pharmazeutische Hilfsstoffe, wie z. B. Trägermaterialien, Füllstoffe, Lösungsmittel, Verdünnungsmittel, oberflächenaktive Stoffe, Farbstoffe, Konservierungsstoffe, Sprengmittel, Gleitmittel, Schmiermittel, Aromen und/oder Bindemittel. Diese Hilfsmittel können beispielsweise sein: Wasser, Ethanol, 2-Propanol, Glycerin, Fructose, Laktose, Saccharose, Dextrose, Melasse, Stärke, modifizierte Stärke, Gelatine, Sorbitol, Inositol, Mannitol, mikrokristalline Cellulose, Methylcellulose, Carboxymethylcellulose, Celluloseacetat, Schellack, Cetylalkohol, Polyvinylpyrrolidon, Paraffine, Wachse, natürliche und synthetische Gummis, Akaziengummi, Alginate, Dextran, gesättigte und ungesättigte Fettsäuren, Stearinsäure, Magnesiumstearat, Zinkstearat, Glycerylstearat, Natriumlaurylsulfat, genießbare Öle, Sesamöl, Kokosnussöl, Erdnussöl, Sojabohnenöl, Lecitin, Natriumlactat, Polyoxyethylen- und -propylenfettsäureester, Sorbitanfettsäureester, Sorbinsäure, Benzoessäure, Zitronensäure, Ascorbinsäure, Tanninsäure, Natriumchlorid, Kaliumchlorid, Magnesiumchlorid, Calciumchlorid, Magnesiumoxid, Zinkoxid, Siliciumoxid, Titanoxid, Titandioxid, Magnesiumsulfat, Zinksulfat, Calciumsulfat, Pottasche, Calciumphosphat, Dicalciumphosphat, Kaliumbromid, Kaliumjodid, Talkum, Kaolin, Pectin, Crospovidon, Agar und Bentonit.

Die Auswahl der Hilfsstoffe sowie der einzusetzenden Mengen derselben hängt davon ab, ob das Medikament oral, subkutan, parenteral, intravenös, pulmonal, intraperitoneal, transdermal, intramuskulär, nasal,

buccal, rektal oder auf andere geeignete Weise appliziert werden soll. Für die orale Applikation eignen sich u. a. Zubereitungen in Form von Tabletten, Dragees, Kapseln, Granulaten, Tropfen, Säften und Sirupen, für die parenterale, topische und inhalative Applikation Lösungen, Suspensionen, leicht rekonstruierbare Pulver zur Inhalation sowie Sprays. In geeigneten perkutanen Applikationsformen kann der Wirkstoff in einem Depot in gelöster Form oder in einem Pflaster, gegebenenfalls unter Zusatz von Hautpenetrationen fördernden Mitteln, vorliegen. Rektal, transmucosal, parenteral, oral oder perkutan anwendbare Zubereitungsformen können die erfindungsgemäßen Peptide verzögert freisetzen.

In flüssiger Form können die erfindungsgemäßen Peptide beispielsweise intravenös, oral, als Nasenspray, subkutan, intramuskulär, inhalativ oder in oder neben das Rückenmark appliziert werden. Weiterhin können die erfindungsgemäßen Wirkstoffe mittels Salben oder Cremes aufgebracht werden.

Die erfindungsgemäßen Peptide können am Wirkort oder an anderen Orten des Organismus entstehen, nachdem Nukleinsäuren (DNA und RNA oder eine Kombination davon), die für die erfindungsgemäßen Peptide kodieren, in den Organismus eingebracht werden. Dies kann durch virale Vektoren, nackte Nukleinsäure (DNA, RNA), Plasmide, künstliche Viruspartikel, Liposomen erreicht werden, die intravenös, intranasal, oral, rektal, subkutan, intramuskulär, in oder an das Rückenmark in den Körper eingebracht werden.

Die erfindungsgemäßen Peptide können auch zur Prävention der oben genannten Krankheiten verwendet werden. Hierzu müssen die erfindungsgemäßen Peptide so appliziert werden, dass sie ihren Wirkort erreichen. Dieser
5 Wirkort kann das Gehirn, das Rückenmark und/oder das gesamte Nervensystem sein, aber auch jeder andere Teil des Organismus. Hierzu können die erfindungsgemäßen Peptide in fester oder in einem Lösungsmittel, (vorzugsweise Wasser) gelöster Form in den Körper einge-
10 bracht werden. Als Feststoff können die Peptide beispielsweise oral, rektal oder als Pulver in die Nase eingeführt werden.

In flüssiger Form können die erfindungsgemäßen Peptide beispielsweise intravenös, oral, als Nasenspray, subkutan, intramuskulär, inhalativ oder in bzw. neben das
15 Rückenmark appliziert werden. Weiterhin können die erfindungsgemäßen Wirkstoffe mittels Salben oder Cremes aufgebracht werden.

Die erfindungsgemäßen Peptide können am Wirkort oder an anderen Orten des Organismus entstehen, nachdem Nukleinsäuren (DNA und RNA oder eine Kombination davon) die für die erfindungsgemäßen Peptide kodieren in den Organismus eingebracht werden. Dies kann erreicht werden durch virale Vektoren, nackte Nukleinsäuren (DNA,
20 RNA), Plasmide, künstliche Viruspartikel, Liposomen, die intravenös, intranasal, oral, rektal, subkutan, intramuskulär, in oder an das Rückenmark in den Körper eingebracht werden.
25

Zur Verbesserung der Bindungs-, Lösungs-, und Wirkeigenschaften können die erfindungsgemäßen Peptide noch
30 modifiziert werden, so dass die Wasserlöslichkeit, de-

ren Stabilität, die Bioverfügbarkeit und die Affinität zum Anhaften am PrP^C vergrößert wird. Diese Modifikationen können beispielsweise Zuckerreste, Glukoronsäuren, Sulfatreste, Serin, Glycin oder Aspartat sein.

5 Weiterhin können die erfindungsgemäßen Peptide mit Antikörpern oder Fragmenten davon auf übliche Weise verknüpft werden, um bei einer therapeutischen Anwendung des erfindungsgemäßen Proteins Bestandteile des Immun-

10

Als zu behandelnde Krankheitsbilder können das Creutzfeld-Jakob-Syndrom, Kuru, das Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom sowie Fatal Familia Insomnia (FFI) beispielhaft genannt werden.

15

Methodisches:

20

Phagendisplay ist eine Technik, die es ermöglicht Peptid-Bibliotheken mit randomisierten Aminosäuresequenzen zu konstruieren und diese nach Liganden für ein bestimmtes Zielmolekül zu durchsuchen. Die Peptidbibliothek ist dabei als Fusion aus Peptid und einem Phagenhüllprotein auf der Oberfläche von Bakteriophagen präsentiert ("phage display"). Die Diversität der präsentierten Peptide wird durch die Insertion einer kombinatorisch mutierten DNA als Peptid-kodierender Teil des Fusionsgens erreicht. Auf diese Weise wird eine extrem große Zahl von Phagen erzeugt, wobei jeder Phage ein anderes Peptid präsentiert. Das Konstruieren, Vermehren und Selektieren wird als "Biopanning" bezeichnet. Die Bibliothek wird mit einem immobilisierten Zielmolekül

25

inkubiert, wobei der nicht-bindende Teil der Peptid-Bibliothek gewaschen und der bindende Teil anschließend eluiert wird. Die dadurch angereicherte Population von Phagen, die ein mit dem Zielmolekül interagierendes
5 Peptid präsentieren, werden amplifiziert, indem man mit ihnen Bakterien infiziert. Die Screening-Amplifikations-Prozedur kann mehrmals wiederholt werden, um die Bibliotheks-Mitglieder weiter anzureichern, die eine relativ höhere Affinität zum Zielmolekül besitzen. Das
10 Ergebnis ist eine Peptid-Population, die dominiert wird von den Aminosäuresequenzen, die das Zielmolekül am besten binden.

Verwendet wurde eine kommerzielle Phagenbibliothek mit 12 randomisierten Aminosäuren (New England Biolabs,
15 Frankfurt). Hier ist an das Phagenhüllprotein kodierende gp3-Gen nach der Signalsequenz N-terminal die Bibliothek inseriert. Diese besteht aus $1,9 \times 10^9$ unabhängigen Klonen und ist so amplifiziert und konzentriert, dass in 10 μ l durchschnittlich jede Sequenz in 55 Ko-
20 pien vorliegt.

Zur Durchführung der Selektion gegen das rekombinante Prionprotein (rPrP) aus Hamster wurde rekombinant her-
gestelltes Hamster-Prionprotein in einer Konzentration zwischen 0,01 μ g/ml und 0,1 μ g/ml in PBS mit 0,2% SDS, pH
25 7,2 mit Hilfe des "Protein Immobilizer Kit" (Exiqon) in einer Mikrotiterplattenvertiefung immobilisiert. Hierfür wurden jeweils 100 μ l Proteinlösung für 2 Stunden unter sanftem Schütteln inkubiert. Nach Entfernen der Lösung wurde 3 mal mit 200 μ l PBS gewaschen.

Für die Selektion wurden 10 µl Phagen der kommerziellen Phagenbibliothek in 100 µl PBST mit 0,1% BSA 10 Minuten unter leichtem Schütteln in einer rPrP-beschichteten Mikrotiterplattenvertiefung inkubiert. Die nicht gebundenen Phagen wurden verworfen und anschließend 10 mal mit 300 µl PBST gewaschen. Die Elution erfolgte mit 100 µl 0,2 M Glycin-HCl, pH 2,2 für 10 Minuten unter leichtem Schütteln. Das Eluat wurde in 15 µl Tris-HCl, pH 9, 1 neutralisiert.

Das Eluat wurde in 20 ml *E. coli*-Kultur gegeben und für 4, 5 Stunden bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Anschließend wurde die Kultur 10 Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde überführt und 1/6 Volumen PEG/NaCl zugegeben. Der Ansatz wurde nun über Nacht bei 4 °C gefällt. Danach wurde 20 Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml PBS resuspendiert. Anschließend wurde 5 Minuten bei 10000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde überführt und 1/6 Volumen PEG/NaCl zugegeben. Der Ansatz wurde 1 Stunde auf Eis gefällt. Abschließend wurde 60 Minuten zentrifugiert und das Pellet in 100 µl TBS resuspendiert. Die so erhaltenen Phagen konnten nun in der nächsten Runde eingesetzt werden. Insgesamt wurden fünf Selektionsrunden durchgeführt. Anschließend wurden willkürlich ausgewählte Phagenklone isoliert und die Aminosäuresequenz der auf diesen Phagen präsentierten Peptide über den Umweg der DNA-Sequenzierung des im Phagengenom kodierten Peptids bestimmt. Das Ergebnis sind die insgesamt 27 verschiedenen Aminosäuresequenzen im Sequenzprotokoll.

In einem Zellkulturessay mit infizierten N2a-Zellen wurde gezeigt, dass alle untersuchten Peptide in der Lage waren, die Menge an gebildetem PrP^{Sc} zu verringern.

5 Beispiel:

Versuchsbeschreibung

Prion infizierte Zellen werden eine Woche lang kultiviert und dann auf die Bildung von PrP^{Sc} hin untersucht. Dies funktioniert so, dass man die Zellen ly-
10 siert und mit 20 µg/ml Proteinase K (PK) behandelt. Dadurch wird PrP^C verdaut und nur das PK-resistente PrP^{Sc} bleibt übrig. Das PK-behandelte Zelllysate wird einer denaturierenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) unterworfen und auf eine Membran geblottet und
15 anschließend mit einem PrP-spezifischen Antikörper angefärbt ("Western-Blot"). Figur 1 zeigt das Bandenmuster des PK-behandelten Zelllysats. Die Peptide W1, W2, W3 und W4 entsprechen dabei den Sequenzen 8,2,10 und 1 gemäß dem Sequenzprotokoll. Dabei entsteht ein typi-
20 sches Bandenmuster (siehe Spur 1 in der unteren Abbildung).

In Anwesenheit von Substanzen, die die Vermehrung von Prionen inhibieren (Quinacrine als positive Kontrolle) ist kein oder ein deutlich schwächeres Bandenmuster zu
25 sehen (Spur 2 und 3).

Bei Behandlung der Prion infizierten N2a-Zellen mit den Peptiden W1, W2, W3 und W4 ist eine konzentrationsabhängige Abnahme der PrP-Banden im Westernblot zu sehen (übrige Spuren). Das bedeutet, dass die Peptide inhi-
30 bierend auf die Replikation der Prionen wirken.

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Mittel,
dadurch gekennzeichnet,
dass es mindestens eine Komponente aus mindestens
einer der Gruppen A) bis R) ist oder umfasst:

- 5 A) Val und Asp, Met und Ile, Asp und Val, Gln
 und Pro, Thr und Pro, Leu und Asp, Asp und
 Ser, Arg und His, Thr und Tyr, Val und Tyr,
 Arg und Pro, Pro und Leu, Leu und Pro, Pro
10 und Ser, Ser und Pro, Leu und Lys, Lys und
 Ala, Ala und Thr, Thr und Thr, Thr und Asn,
 Asn und Ser, Ser und Lys, Lys und Leu, Leu
 und Met, Met und Met, Met und Tyr, Trp und
 His, His und Trp, Trp und Gln, Gln und Trp,
15 Trp und Thr, Thr und Pro, Pro und Trp, Trp
 und Ser, Ser und Ile, Ile und Gln, Gln und
 Pro.
- B) Leu und Asp und Ser, Val und Asp und Met,
 Asp, Met und Ile, Met, und Ile und Asn, Asp
 und Val und Gln, Val und Gln und Pro, Gln und
20 Pro und Leu, Gln und Pro und Met, Pro und Leu
 und Thr, Leu und Thr und Pro, Leu und Asp und
 Ser, Asp und Ser und Ser, Asp und Ser und
 Cys, Arg und His und Ala, His und Ala und
 Thr, Ala und Thr und Tyr, Val und Tyr und
25 Ser, Tyr und Ser und Ser, Arg und Pro und
 Leu, Pro und Leu und Pro, Leu und Pro und

Ser, Pro und Ser und Pro, Leu und Lys und
Ala, Lys und Ala und Thr, Ala und Thr und
Thr, Thr und Thr und Asn, Thr und Asn und
Ser, Asn und Ser und Lys, Ser und Lys und
5 Leu, Lys und Leu und Met, Leu und Met und
Met, Met und Met und Tyr, Trp und His und
Trp, His und Trp und Gln, Trp und Gln und
Trp, Gln und trp und Thr, Trp und Thr und
Pro, Thr und Pro und Trp, Pro und Trp und
10 Ser, Trp und Ser und Ile, Ser und Ile und
Gln, Ile und Gln und Pro.

C) Val und Asp und Met und Ile, Asp und Val und
Ile und Pro, Leu und Asp und Ser und Ser, Arg
und His und Ala und Thr, His und Ala und Thr
15 und Tyr, Val und Tyr und Ser und Ser, Arg und
Pro und Leu und Pro, Pro und Leu und Pro und
Ser, Leu und Pro und Ser und Pro, Leu und Lys
und Ala und Thr, Lys und Ala und Thr und Thr,
Ala und Thr und Thr und Asn, Thr und Thr und
20 Asn und Ser, Thr und Asn und Ser und Lys, Asn
und Ser und Lys und Leu, Ser und Lys und Leu
und Met, Lys und Leu und Met und Met, Leu und
Met und Met und Tyr, Trp und His und Trp und
Gln, His und Trp und Gln und Trp, Trp und Gln
25 und Trp und Thr, Gln und Trp und Thr und Pro,
Trp und Thr und Pro und Trp, Thr und Pro und
Trp und Ser, Pro und Trp und Ser und Ile, Trp
und Ser und Ile und Gln, Ser und Ile und Gln
und Pro.

- D) Val und Asp und Met und Ile und Asn, Asp und Met und Ile und Asn und Asp, Met und Ile und Asn und Asp und Val, Ile und Asn und Asp und Val und Gln, Asn und Asp und Val und Gln und Pro, Asp und Val und Gln und Pro und Leu, Asn und Asp und Val und Gln und Pro, Asp und Val und Gln und Pro und Leu, Val und Gln und Pro und Leu und Thr, Gln und Pro und Leu und Thr und Pro, Leu und Asp und Ser und Ser und Arg, Arg und His und Ala und Thr und Tyr, Leu und Lys und Ala und Thr und Thr, Lys und Ala und Thr und Thr und Asn, Ala und Thr und Thr und Asn und Ser, Thr und Thr und Asn und Ser und Lys, Thr und Asn und Ser und Lys und Leu, Asn und Ser und Lys und Leu und Met, Ser und Lys und Leu und Met und Met, Lys und Leu und Met und Met und Tyr, Trp und His und Trp und Gln und Trp, His und Trp und Gln und Trp und Thr, Trp und Gln und Trp und Thr und Pro, Gln und Trp und Thr und Pro und Trp, Trp und Thr und Pro und Trp und Ser, Trp und Thr und Pro und Trp und Ile, Thr und Pro und Trp und Ile und Gln, Pro und Trp und Ile und Gln und Pro.
- E) Val und Asp und Met und Ile und Asn und Asp, Val und Gln und Pro und Leu und Thr und Pro, His und Ser und Pro und Leu und Asp und Ser, Ser und Arg und His und Ala und Thr und Tyr, Leu und Lys und Ala und Thr und Thr und Asn, Lys und Ala und Thr und Thr und Asn und Ser, Ala und Thr und Thr und Asn und Ser und Lys,

Thr und Thr und Asn und Ser und Lys und Leu,
Thr und Asn und Ser und Lys und Leu und Met,
Asn und Ser und Lys und Leu und Met und Met,
Ser und Lys und Leu und Met und Met und Tyr,
5 Trp und His und Trp und Gln und Trp und Thr,
Trp und Gln und Trp und Thr und Pro und Trp,
Trp und Thr und Thr und Pro und Trp und Ser
und Ile, Pro und Trp und Ser und Ile und Gln
und Pro.

10 F) Asp und Val und Gln und Pro und Leu und Thr
und Pro, Leu und Asp und Ser und Ser und Arg
und His und Ala, Ser und Ser und Arg und His
und Ala und Thr und Tyr, Leu und Lys und Ala
15 und Thr und Thr und Asn und Ser, Lys und Ala
und Thr und Thr und Asn und Ser und Lys und
Leu, Thr und Thr und Asn und Ser und Lys und
Leu und Met, Thr und Asn und Ser und Lys und
Leu und Met und Met, Asn und Ser und Lys und
20 Leu und Met und Met und Tyr, Trp und His und
Trp und Gln und Trp und Thr und Pro, Gln und
Trp und Thr und Pro und Trp und Ser und Ile,
Thr und Pro und Trp und Ser und Ile und Gln
und Pro.

25 G) Mindestens zwei Komponenten aus mindestens
einer der Gruppen A) bis F).

H) Sequenzen 1 - 27 des Sequenzprotokolls, wel-
che alle 12 Aminosäuren mit den Positionen 1
- 12 umfassen.

- 5 I) Aminosäuresequenzen, die in den Positionen 1, 2, 3 und 4 die Aminosäuren Leu, Lys, Ala, und Thr beinhalten.
- J) Aminosäuresequenzen, die in den Positionen 6, 7, 8 und 9 die Aminosäuren Asn, Ser, Lys und Leu besitzen.
- K) Aminosäuresequenzen, die eine Kombination der Merkmale I) und J) beinhalten.
- 10 L) Aminosäuresequenzen, die in den Positionen 4, 5 und 6 die Aminosäuren Gln, Trp und Thr besitzen.
- M) Aminosäuresequenzen, die in den Positionen 8 und 9 die Aminosäuren Arg und His besitzen.
- 15 N) Aminosäuresequenzen, die in den Positionen 11 und 12 die Aminosäuren Thr und Tyr besitzen.
- O) Alle Unterkombinationen mit 2 oder 3 Elementen der Gruppen L), M) und N).
- P) Aminosäuresequenzen, die in den Positionen 1 und 2 die Aminosäuren Val und Tyr besitzen.
- 20 Q) Aminosäuresequenzen, die in den Positionen 7, 8, 9, 10, 11, 12 die Aminosäuren Arg, Pro, Leu, Pro, Ser und Pro besitzen.

R) Aminosäuresequenzen, die eine Kombination aus N) und O) darstellen.

2. Mittel nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
5 dass es in fester, halbflüssiger oder flüssiger Form vorliegt.
3. Mittel nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet,
10 dass es in Form von Injektionslösungen, Tropfen, Säften, Sirupen, Spray, Suspensionen, Granulaten, Tabletten, Pellets, transdermalen therapeutischen Systemen, Kapseln, Pflastern, Zäpfchen, Salben, Cremes, Lotionen, Gelen, Emulsionen oder Aerosolen vorliegt.
- 15 4. Mittel nach Anspruch 3
dadurch gekennzeichnet,
dass es Hilfsstoffe, wie z. B. Trägermaterialien, Füllstoffe, Lösungsmittel, Verdünnungsmittel, ober-
20 flächenaktive Stoffe, Farbstoffe, Konservierungsstoffe, Sprengmittel, Gleitmittel, Schmiermittel, Aromen und/oder Bindemittel enthält.
5. Mittel nach einem der Ansprüche 1 bis 4,
dadurch gekennzeichnet,
25 dass es mit mindestens einer Komponente aus der Gruppe Zuckerreste, Glukoronsäuren, Sulfatreste, Serin, Glycin oder Aspartat modifiziert bzw. substituiert sind.

6. Nukleinsäure, kodierend für die Peptide nach Anspruch 1.
7. Nukleinsäure nach Anspruch 6,
dadurch gekennzeichnet,
5 dass sie eine DNA, eine RNA, eine mRNA oder eine Mischung aus mindestens zwei Komponenten davon ist.
8. Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 6 oder 7,
dadurch gekennzeichnet,
10 dass sie als nackte Nukleinsäure oder verpackte Nukleinsäure, als Vektor, Plasmid, in Liposomen eingebunden oder als Phage vorliegt.
9. Verfahren zur Herstellung eines Mittels nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
15 dass eine Festphasensynthese oder eine Synthese in flüssiger Phase eingesetzt wird.
10. Verfahren zur Herstellung eines Mittels nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
20 dass ein Peptid nach Anspruch 1 aus einer für diese Peptidsequenz kodierenden Nukleinsäure exprimiert wird.
11. Verwendung der Peptide gemäß Anspruch 1 zur Herstellung eines Arzneimittels.
- 25 12. Heil- und Behandlungsverfahren sowie Verfahren zur Prävention der Krankheit TSE,
dadurch gekennzeichnet,

dass an den Patienten ein Mittel nach einem der Ansprüche 1 bis 5 und/oder eine Nukleinsäure nach den Ansprüchen 6 bis 8 verabreicht wird.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Forschungszentrum Juelich GmbH

<120> Mittel und Verfahren zur Behandlung und Prävention von
TSE, sowie Verfahren zur Herstellung des Mittels

<130> PT1.2095

<140>

<141>

<160> 27

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 12

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
chemische Synthese

<400> 1

Leu Lys Ala Thr Thr Asn Ser Lys Leu Met Met Tyr
1 5 10

<210> 2

<211> 12

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
chemische Synthese

<400> 2

Val Asp Met Ile Asn Asp Val Gln Pro Leu Thr Pro
1 5 10

<210> 3

<211> 12

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
chemische Synthese

<400> 3

Val Asp Met Ile Asp Asp Val Gln Pro Leu Thr Pro
1 5 10

<210> 4

<211> 12

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
chemische Synthese

<400> 4

Val	Asp	Met	Ile	Asn	Asp	Val	Gln	Pro	Met	Thr	Pro
1				5					10		

<210> 5

<211> 12

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
chemische Synthese

<400> 5

Val	Tyr	Met	Met	Asn	Asn	Gly	Gln	Pro	Pro	Ser	Pro
1				5					10		

<210> 6

<211> 12

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
chemische Synthese

<400> 6

Val	Asp	Met	Ile	Asn	Asp	Val	Gln	Pro	Met	Ser	Pro
1				5					10		

<210> 7

<211> 12

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
chemische Synthese

<400> 7

Trp	His	Trp	Gln	Trp	Thr	Pro	Trp	Ser	Ile	Gln	Pro
1				5					10		

<210> 8

<211> 12

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
chemische Synthese

<400> 8

His Ser Pro Leu Asp Ser Ser Arg His Ala Thr Tyr
1 5 10

<210> 9

<211> 12

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
chemische Synthese

<400> 9

His Tyr Thr Leu Asp Ser Cys Arg His Pro Thr Tyr
1 5 10

<210> 10

<211> 12

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
chemische Synthese

<400> 10

Val Tyr Ser Ser Thr Thr Arg Pro Leu Pro Ser Pro
1 5 10

<210> 11

<211> 12

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
chemische Synthese

<400> 11

Val Tyr Ser Ser Asn Thr Arg Pro Leu Pro Ser Pro
1 5 10

<210> 12

<211> 12

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
chemische Synthese

<400> 12

Val Tyr Ser Ser Asn Asn Arg Pro Leu Pro Ser Pro
1 5 10

<210> 13

<211> 12

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
chemische Synthese

<400> 13

Val Tyr Leu Leu Asn Asn Arg Pro Leu Pro Ser Pro
1 5 10

<210> 14

<211> 12

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
chemische Synthese

<400> 14

Val Tyr Leu Leu Ser Thr Arg Pro Leu Pro Ser Pro
1 5 10

<210> 15

<211> 12

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
chemische Synthese

<400> 15

Val Tyr Trp Pro Thr Asn Arg Pro Leu Pro Ser Pro
1 5 10

<210> 16

<211> 12

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
chemische Synthese

<400> 16

Val Gln Pro Ser Ile Asn Arg Pro His Gln Arg Pro

1

5

10

<210> 17

<211> 12

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
chemische Synthese

<400> 17

Tyr His Asn Tyr Thr Thr Ala Pro His Ser Pro Ser
1 5 10

<210> 18

<211> 12

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
chemische Synthese

<400> 18

Lys Pro Val Ile Ser Pro Thr Asn Ala Leu Gln Pro
1 5 10

<210> 19

<211> 12

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
chemische Synthese

<400> 19

Val Thr Gly Pro Thr Lys Asn Leu Pro Ala Thr Thr
1 5 10

<210> 20

<211> 12

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
chemische Synthese

<400> 20

Ala Ser His Val Asp Tyr Arg Arg Phe Leu Leu Thr
1 5 10

<210> 21

<211> 12

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
chemische Synthese

<400> 21

Asp	Gln	Asp	Phe	Ala	Pro	Asp	Arg	His	Tyr	Arg	Leu
1				5					10		

<210> 22

<211> 12

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
chemische Synthese

<400> 22

Gln	Lys	Trp	Pro	Glu	Thr	Tyr	Pro	Asp	Leu	Ser	Phe
1				5					10		

<210> 23

<211> 12

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
chemische Synthese

<400> 23

Gly	Asp	Pro	Val	Pro	Gln	Thr	Tyr	Ser	Ala	Ala	Gly
1				5					10		

<210> 24

<211> 12

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
chemische Synthese

<400> 24

Ala	Val	Ser	Val	Asn	Thr	Lys	Ile	Asp	Thr	Glu	Ala
1				5					10		

<210> 25

<211> 12

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
chemische Synthese

<400> 25

Gln Pro Asn Tyr Thr Ser Leu Leu Tyr Gly Thr Ala
1 5 10

<210> 26

<211> 12

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
chemische Synthese

<400> 26

Thr Gln Pro Pro Ile His His Tyr Gln Leu Pro Ala
1 5 10

<210> 27

<211> 12

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
chemische Synthese

<400> 27

Gly Trp Asp His Ile His Gly Val His Gln His Val
1 5 10

THIS PAGE BLANK (USPTO)

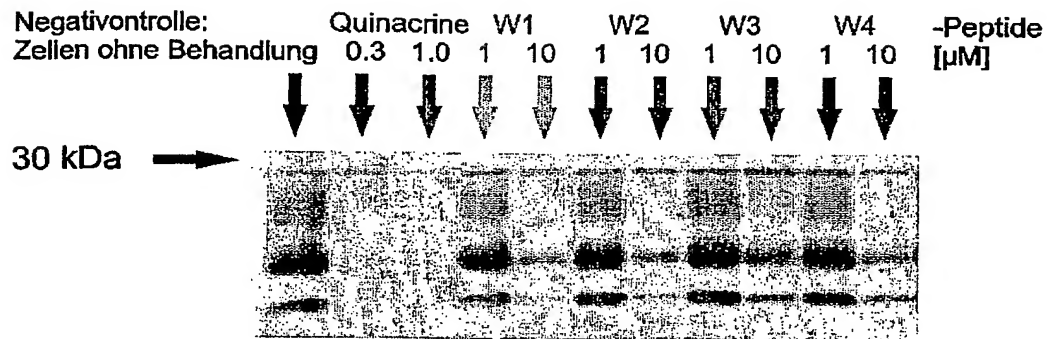


Fig.1

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE2004/001738

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K38/05 C07K5/06 A61P25/28

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K C07K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, INSPEC, EMBASE, BIOSIS, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SOTO CLAUDIO ET AL: "Reversion of prion protein conformational changes by synthetic beta-sheet breaker peptides" LANCET, LITTLE, BROWN AND CO., BOSTON,, US, vol. 355, no. 9199, 15 January 2000 (2000-01-15), pages 192-197, XP002176229 ISSN: 0099-5355 the whole document page 193, column 1, line 4 page 194, column 2, last line	1-12
X	WO 02/18341 A (WANG JINHAI ; ENZYME SYST PROD INC (US)) 7 March 2002 (2002-03-07)	1-5,9,11
Y	claims 16,32 examples 4-6,11a-11c,13,1518,20	1-12
	----- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

8 December 2004

Date of mailing of the international search report

08. 04. 2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Fayos, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE2004/001738

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SOTO C: "Altering prion replication for therapy and diagnosis of transmissible spongiform encephalopathies." BIOCHEMICAL SOCIETY TRANSACTIONS. AUG 2002, vol. 30, no. 4, August 2002 (2002-08), pages 569-574, XP009041065 ISSN: 0300-5127 page 571, column 1, paragraph 3 - column 2, paragraph 2 -----	1-12
P,Y	COLLINS P S J ET AL: "Transmissible spongiform encephalopathies" LANCET THE, LANCET LIMITED. LONDON, GB, vol. 363, no. 9402, 31 December 2003 (2003-12-31), pages 51-61, XP004483015 ISSN: 0140-6736 the whole document -----	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

DE2004/001738

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see supplemental sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Invention 1: Claims 1 and 2-12, all in part

Remark on Protest

☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐

No protest accompanied the payment of additional search fees.

The International Searching Authority has determined that this international application contains multiple (groups of) inventions, namely

Invention 1: Claims 1 and 2-12, all in part

agent characterized in that it is or comprises at least Val and Asp.

Inventions 2-172: Claims 1 and 2-12, all in part

agent characterized in that it is or comprises at least one other component from at least one of groups A) to R).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE2004/001738

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0218341	A	07-03-2002	US 2002052323 A1	02-05-2002
			AU 8838101 A	13-03-2002
			CA 2420667 A1	07-03-2002
			CN 1466576 A	07-01-2004
			EP 1322616 A2	02-07-2003
			JP 2004521078 T	15-07-2004
			WO 0218341 A2	07-03-2002

THIS PAGE BLANK (USPTO)